

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15390

研究課題名（和文）新規細胞性免疫誘導型アジュバントを用いた百日咳ワクチンの開発

研究課題名（英文）Development of novel pertussis vaccine

研究代表者

黒田 悦史（Kuroda, Etsushi）

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授（常勤）

研究者番号：10299604

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：近年百日ぜきが再興感染症として注目されているが、その要因として現行のワクチンでは百日ぜき菌の排除に重要とされている細胞性免疫の誘導が弱いことが理由の一つと考えられている。現行の百日ぜきワクチンにはアルミニウム塩（アラム）がアジュバントとして添加されているが、アラムでは細胞性免疫の誘導が弱いことが示されている。そのため、新規百日ぜきワクチン開発のためには添加するアジュバントの見直しが必要である。本研究では我々が見出したCpG ODNとSTINGアゴニストを組み合わせた細胞性誘導型コンビネーションアジュバント（CpG+STINGアゴニスト）を用い、新規百日ぜきワクチンを開発することを目標とする。

研究成果の概要（英文）：Recently, pertussis is known as one of re-emerging infectious diseases. One of main reasons is that current pertussis vaccine cannot fully induce cell-mediated immunity which is important for elimination of *Bordetella pertussis* infection. Current pertussis vaccine contains aluminum salt (alum) as a vaccine adjuvant, but alum is known to mainly induce humoral immunity and, to weakly activate cell-mediated immunity. To improve pertussis vaccine, selection of adequate vaccine adjuvant must be required. Recently, we found that the combination of CpG ODN and STING agonist functions as vaccine adjuvant and synergistically induces Th1-type cellular immunity. In this study, we investigate the development of novel pertussis vaccine using CpG+STING agonist combination adjuvant.

研究分野：免疫学

キーワード：百日ぜきワクチン 細胞性免疫 CpG ODN STINGアゴニスト

1. 研究開始当初の背景

近年欧米諸国において百日ぜきが再興感染症として注目されているが、日本においても年々百日ぜき患者数が増加している。その要因として、現行の三種混合ワクチンでは終生免疫の誘導が難しく、持続時間が4~12年と短いこと、さらに百日ぜき菌の排除に重要とされている細胞性免疫の誘導が弱いことなどが示されている。現行の三種混合(四種混合)および百日ぜきワクチンにはアルミニウム塩(アラム)がアジュバントとして添加されているが、アラムは液性免疫(抗体産生、Th2型免疫応答)誘導型のアジュバントであり、細胞傷害性T細胞やNK細胞、マクロファージなどを活性化させる細胞性免疫(Th1型免疫応答)の誘導は弱いことが示されている。現行のワクチンを改良し、百日ぜき菌の排除に効果的な細胞性免疫を誘導するワクチンを開発する必要があり、そのためには添加するアジュバントの見直しが必要である。百日ぜき菌の排除と同様に、治療のために細胞性免疫の誘導が必要とされる疾患としてがんやアレルギーが挙げられるが、最近、CpGオリゴデオキシヌクレオチド(CpG ODN)をはじめとする核酸由来アジュバントがそれらの疾患の治療に有効であることが報告されている。そのような背景から、新規百日ぜきワクチンのアジュバントの選択にも核酸由来アジュバントが有効であると考えられる。

2. 研究の目的

我々はこれまでCpG ODNをベースとした細胞性免疫誘導型のアジュバント開発を行っており、最近CpG ODNに細胞内核酸認識受容体であるSTINGのアゴニストを組み合わせたコンビネーションアジュバント(CpG+STINGアゴニスト)が強力に細胞性免疫を増強し、抗原特異的なIFN- γ やIgG2c誘導を始めとしたTh1型免疫応答誘導型アジュバントとして機能することを見出した。そこで本研究ではCpG+STINGアゴニストの強力な細胞性免疫誘導能を新規百日ぜきワクチンのアジュバントとして応用し、細胞性免疫型の百日ぜきワクチンの開発を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) コンビネーションアジュバント(CpG+STINGアゴニスト)の経鼻ワクチンアジュバントとしての有効性に関する検討

百日ぜき菌の飛沫感染に対応するために、経鼻型の粘膜ワクチンの検討を行った。まずはモデル抗原として卵白アルブミン(OVA)を用い、OVAのみ、CpG+OVA、STINGアゴニスト+OVA、コンビネーションアジュバント+OVAを経鼻投与する。14日後に再度経鼻免疫を行った後、21日目に採血し、血清中の抗原特異

的な抗体価の測定、脾細胞の抗原特異的なサイトカイン産生を検討した。また肺胞洗浄液や鼻腔洗浄液も回収し、IgA抗体価についても検討した。STINGアゴニストとしてc-di-GMP、c-di-AMPおよびcGAMPを用いた。

(2) 百日ぜき由来抗原とコンビネーションアジュバント(CpG+STINGアゴニスト)の経鼻ワクチンとしての有効性に関する検討

実験(1)の結果をもとに、百日ぜき由来抗原を用いた検討を行う。抗原は研究試薬として市販されている変異型百日ぜき毒素(Pertussis Toxin mutant:PTm)および血球凝集素(Filamentous Hemagglutinin: FHA)を使用する。PTm+FHAを抗原のみ、抗原+CpG、抗原+STINGアゴニスト、抗原+コンビネーションアジュバントを経鼻投与する。実験(1)と同様に血清、肺胞洗浄液および鼻腔洗浄液を回収し、FHAあるいはPT特異的抗体価の誘導を検討した。

4. 研究成果

従来のアラムアジュバントを経鼻のワクチンアジュバントに用いると、肺や気管支を中心に強いアレルギー性炎症を引き起こすことが知られている。そこでCpG ODNとSTINGのアゴニストを組み合わせたコンビネーションアジュバント(CpG+STINGアゴニスト)をアジュバントにした経鼻ワクチンの検討を行った。

(1) コンビネーションアジュバント(CpG+STINGアゴニスト)の経鼻ワクチンアジュバントとしての有効性に関する検討

OVAをモデル抗原として経鼻ワクチンの効果を検討したところ、血清中の抗原特異的IgG2cが誘導され、特にコンビネーションアジュバントを用いたときに高値を示した。さらに経鼻投与では血清のみならず肺や鼻腔内の抗体が誘導されるが、肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid: BALF)や鼻腔洗浄液(nasal wash)中の抗体価も測定したところ、抗原特異的な抗体の誘導が認められ、特にコンビネーションアジュバントを用いることで、BALFおよびnasal wash中のIgG2cおよびIgAの誘導が認められた。さらに免疫したマウスの脾細胞を回収し、抗原特異的なサイトカイン産生を評価した。以前に我々はSTINGアゴニストがTh2アジュバントとして機能することを報告したが、経鼻投与においてもSTINGアゴニストのみをアジュバントとして投与することで、抗原特異的なIL-5およびIL-13が誘導された。しかしながらコンビネーションアジュバントの投与ではTh2サイトカインの誘導は顕著に抑制され、抗原特異的なIFN- γ の増強が認められた。これらの結果から、コンビネーションアジュバントは、強力なTh1型免疫応答を誘導するア

ジュバントとして機能し、経鼻にワクチンにおいてはIgAも誘導する粘膜アジュバントとして機能することが明らかになった。以下、図1にBALF中のIgAの誘導の結果と表1に免疫応答をまとめたものを示す。

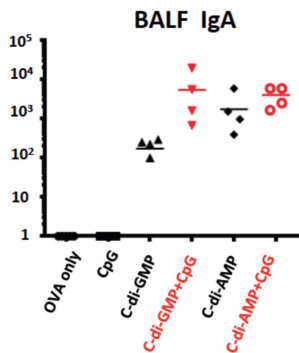


図1 CpG、STINGアゴニストおよびコンビネーションアジュバントの経鼻投与によるBALF中の抗原特異的IgA誘導の一例

Adjuvant	IgG2c	IgA	IFN-γ	IL-5,13	IL-17
CpG	↑↑	↑↑	↑	↓	↓
cGAMP	↑	↓	↓	↑	↓
c-di-GMP	↑	↑	↓	↑	↑
c-di-AMP	↑	↑↑	↑	↑	↑↑
cGAMP+CpG	↑↑	↑↑	↓	↓	↓
c-di-GMP+CpG	↑↑	↑↑	↑↑	↓	↑
c-di-AMP+CpG	↑↑	↑↑	↑↑	↓	↑

表1 CpG、STINGアゴニスト、およびコンビネーション(CpG+STINGアゴニスト)アジュバントの経鼻投与による免疫応答のまとめ

(2) 百日ぜき由来抗原とコンビネーションアジュバント(CpG+STINGアゴニスト)の経鼻ワクチンとしての有効性に関する検討

実験(1)の条件をもとに、百日ぜき由来抗原を用いた経鼻ワクチンの検討を行った。抗原は研究試薬として市販されているPTmとFHAを混合したものをワクチン抗原として使用した。実験(1)と同様のスケジュールで経鼻免疫し、血清、BALF、Nasal wash中の抗体価を測定したところ、コンビネーションアジュバントで高い抗体価を示す傾向が認められたが、抗原のみの投与でも高い抗体価を示すため有意差を持った抗体の誘導は認められなかった(図2)。

これらの結果から、市販の百日ぜき抗原はワクチン抗原とは異なり、抗原性が高いことが示された。

百日ぜき抗原の抗原性が高い理由について、エンドトキシンコンタミの可能性が考えられた。そこで、PTmおよびFHAそれぞれについてエンドトキシンコンタミがあるか否かを解析したところ、特にFHAに100 μg/mg以上の多量のエンドトキシンのコンタミが認められた。この結果より、FHAに含まれるエンドトキシンがアジュバントとなっ

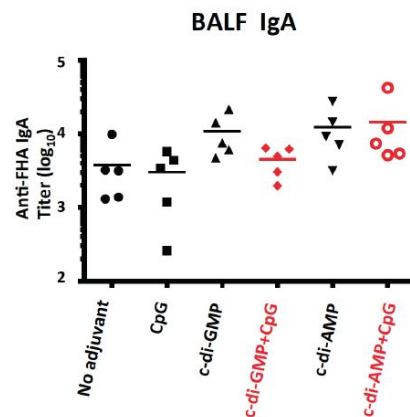


図2 百日ぜき抗原単独(No adjuvant)による抗体価の誘導の例

て、抗原の単独投与において抗体価が誘導されたものと考えられた。一般に医薬品として用いられている百日ぜき抗原においてはエンドトキシンの量は0.1 EU/ml(約0.01 ng/ml)以下に設定されている。

そこで、エンドトキシンの量が少ないPTmのみを使用して経鼻免疫を行った。PTmのみでは抗原性が低いため免疫により誘導される抗体量が低かったが、PTmとコンビネーションアジュバントでの免疫において、PTm特異的な抗体価が誘導された(図3)。この結果よりコンビネーションアジュバントは百日ぜき抗原に対しても有効性が高いことが示唆された。

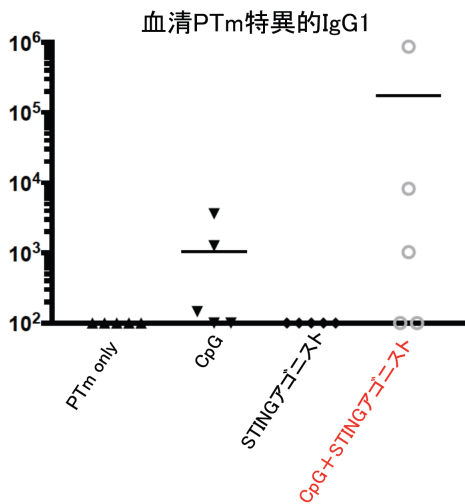


図3 PTmとコンビネーションアジュバントの経鼻投与はPTm特異的抗体を誘導する

アジュバントの有効性に関しては証明することができたが、百日ぜき抗原に関してはPTmのみでは抗原性が低いため、ワクチンとしてはFHAも必要であると考えられた。市販のFHAからカラムなどを用いてエンドトキシンを除去行っていたが0.1 EU/ml(約0.01 ng/ml)以下までのエンドトキシンの除去にまで至らなかった。そこで某製薬会社に依頼してアルミニウムアジュバント添加前のワクチンに使用する抗原の分与を依頼してい

る。H29 以降はワクチン用の低エンドトキシンの抗原を使用して同様の実験を継続して行う予定にしている。

(3)連携研究者
()

研究者番号：

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(4)研究協力者
()

〔雑誌論文〕(計0件)

なし

〔学会発表〕(計 件)

なし

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

なし

出願状況(計0件)

なし

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

なし

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒田 悦史 (KURODA Etsushi)

大阪大学・大阪大学免疫学フロンティア研究センター・特任准教授

研究者番号：10299604

(2)研究分担者

()

研究者番号：